

DERWENT-ACC-NO: 1997-444058

DERWENT-WEEK: 199741

COPYRIGHT 2006 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Liposome type allergy treatment agent - is stable, used
for treatment of allergies to e.g. mites, house dust and
orchard grass

PATENT-ASSIGNEE: KOKURITSU YOBO EISEI KENKYUSHO[KOKUN] , NIPPON OILS &
FATS
CO LTD[NIOF]

PRIORITY-DATA: 1996JP-0011197 (January 25, 1996)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
JP 09202735 A	August 5, 1997	N/A	011	A61K 039/385

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO	APPL-DATE
JP 09202735A	N/A	1996JP-0011197	January 25, 1996

INT-CL (IPC): A61K009/127, A61K039/00 , A61K039/35 , A61K039/36 ,
A61K039/385 , A61K047/24

ABSTRACTED-PUB-NO: JP 09202735A

BASIC-ABSTRACT:

Liposome-type allergy treatment agent comprises a phospholipid having an amino group in the membrane component and an immobilised antigen on the outer aqueous phase of the liposome of particle size 0.1-3 μ m, and a sugar in both the inner and outer phases. Also claimed are: (1) the agent producing 5- to 100-times the amount of immunoglobulin E to IgG production in comparison to that of the single antigen; (2) the allergic antigen which induced an allergy, and (3) the allergic antigens of mite, ragweed, orchard grass and Japanese cedar pollen.

ADVANTAGE - The agent is stable.

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0

TITLE-TERMS: LIPOSOME TYPE ALLERGIC TREAT AGENT STABILISED TREAT
ALLERGIC MITE
HOUSE DUST ORCHARD GRASS

DERWENT-CLASS: B04 D16

CPI-CODES: B04-B04C2; B04-C02; B05-B01P; B07-A02; B10-A07; B12-M11F; B14-G02A;
D05-H07; D05-H10;

CHEMICAL-CODES:

Chemical Indexing M1 *01*

Fragmentation Code

M421 M431 M782 M903 P431 Q620 R033 V288

Chemical Indexing M1 *02*

Fragmentation Code

M423 M431 M782 M903 Q620 R033 V771

Chemical Indexing M1 *03*

Fragmentation Code

M423 M431 M782 M903 Q620 R033 V791

Chemical Indexing M2 *04*

Fragmentation Code

B415 B701 B713 B720 B815 B831 H1 H181 H721 H722

J0 J012 J2 J272 K0 L7 L722 M210 M211 M225

M231 M262 M273 M282 M283 M312 M313 M321 M332 M342

M343 M383 M392 M411 M431 M510 M520 M530 M540 M620

M782 M903 M904 M910 Q620 R033 V0 V771

Specific Compounds

01833M

Registry Numbers

1833U

UNLINKED-DERWENT-REGISTRY-NUMBERS: 1833U

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C1997-141835

PAT-NO: JP409202735A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 09202735 A

TITLE: LIPOSOME-TYPE ALLERGY TREATING AGENT

PUBN-DATE: August 5, 1997

INVENTOR-INFORMATION:

NAME

NAKANO, YOSHIRO

UCHIDA, TETSUYA

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME

COUNTRY

NOF CORP

N/A

KOKURITSU YOBOU EISEI KENKYUSHO

N/A

APPL-NO: JP08011197

APPL-DATE: January 25, 1996

INT-CL (IPC): A61K039/385, A61K009/127 , A61K039/00 , A61K039/35 , A61K039/36
, A61K047/24

ABSTRACT:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject treating agent composed of a liposome containing an antigen immobilized exclusively in the outer water-phase of a specific liposome, containing a sugar in the inner and outer water phases, effective for mitigating allergic diseases, having excellent stability and preservable over a long period.

SOLUTION: This treating agent is composed of a liposome containing an antigen immobilized exclusively in the outer water-phase of a liposome containing an amino group-containing phospholipid as a membrane-constituting component and having particle diameter of 0.1-3 μ m and contains a sugar in the inner and outer water-phases. This liposome-type allergy-treating agent can suppress the production of IgE, increase the formation of IgG and mitigate the allergic symptoms. The ratio of the increment in IgG production to the increment in IgE production is preferably 5-100 times the ratio of the increment in IgG production to the increment in IgE production in the case of single use of the antigen. The allergy antigen is preferably selected from

mite antigen, ragweed antigen, orchard grass antigen and cedar pollen antigen.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-202735

(43) 公開日 平成9年(1997)8月5日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	片内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 39/385			A 6 1 K 39/385	
9/127			9/127	F
				L
39/00			39/00	G
39/35	ABF		39/35	ABF
審査請求 未請求 請求項の数4 OL (全 11 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平8-11197

(22) 出願日 平成8年(1996)1月25日

(71) 出願人 000004341

日本油脂株式会社
東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号

(71) 出願人 591222245

国立予防衛生研究所長
東京都新宿区戸山一丁目23番1号

(72) 発明者 中野 善郎

茨城県つくば市梅園2-15-5

(72) 発明者 内田 哲也

埼玉県浦和市東仲町14-16

(74) 代理人 弁理士 柳原 成

(54) 【発明の名称】 リボソーム型アレルギー治療薬

(57) 【要約】

【課題】 免疫グロブリンIgEの産生を抑制してIgGの産生を増大させ、アレルギー症状を緩和することができ、しかも安定性に優れ、凍結乾燥により長期間の安定保存が可能なりボソーム型アレルギー治療薬を得る。

【解決手段】 アミノ基を有するリン脂質を膜構成成分として含有し、粒径0.1~3μmのリボソームの外水相側のみに抗原が固定化され、内外水相に糖を含む抗原結合リボソームからなるリボソーム型アレルギー治療薬。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アミノ基を有するリン脂質を膜構成成分として含有し、粒径が0.1～3 μ mのリボソームの外水相側のみに抗原が固定化されたリボソームからなるアレルギー治療薬であって、内外水相に糖を含むことを特徴とするリボソーム型アレルギー治療薬。

【請求項2】 IgE産生増強量に対するIgG産生増強量の比が、抗原単独のIgE産生増強量に対するIgG産生増強量の比と比べて5～100倍であることを特徴とする請求項1記載のリボソーム型アレルギー治療薬。

【請求項3】 抗原がアレルギーを引起すアレルギー抗原であることを特徴とする請求項1または2記載のリボソーム型アレルギー治療薬。

【請求項4】 アレルギー抗原がダニ抗原、ブタクサ抗原、カモガヤ抗原およびスギ花粉抗原からなる群から選ばれるアレルギー抗原であることを特徴とする請求項3記載のリボソーム型アレルギー治療薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、リボソームの外水相側のみに抗原が固定化された抗原固定化リボソームからなるリボソーム型アレルギー治療薬、特に減感作療法用のリボソーム型アレルギー治療薬に関する。

【0002】

【従来の技術】いわゆるアレルギー反応を引起す物質として、ダニ抗原、ブタクサ抗原、カモガヤ抗原、スギ花粉抗原等が知られており、アレルギー患者に対してこれらの抗原の水溶液を少量ずつ投与する減感作療法が行われている。しかしながら、単に抗原の水溶液を投与するだけでは投与回数が頻繁にわたったり、必ずしも著しい効果が得られない等、問題点が多い。

【0003】アレルギー反応は抗体の一種であるIgEの産生に関連しているとされているが、アレルギーの治療薬としてIgEの産生を抑制してIgGだけを産生させる種々の技術が開発されている。例えば、抗原タンパク質をポリエチレングリコールで修飾したり(Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 56, p159-170, 1978)、抗原をグルタルアルデヒドで重合したり(Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 74, p332-340, 1984)する方法が試みられているが、抗原に対するIgGの産生が不十分になるなどの問題がある。またアルブミンと多糖類のアルランとを反応させたワクチンが知られている(Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 102, p276-278, 1993)が、やはり十分なIgG産生には至っていない。

【0004】また、リボソーム中に抗原を内包する方法も試みられており(Clinical and Experimental Allergy, Vol. 22 p35-42, 1992)、抗原を内包しない場合と比べて、IgE産生を数分の一程度まで抑制させること

はできる。そしてこの技術を利用したアレルギー患者の治療法が知られている(DE 3412793)。すなわち、DE3412793はアレルギー症状を引起すことが分かっている吸入抗原をリボソームに内包して経口投与する方法であり、腸のバイエル板から吸収され、リンパ管を経て血流内に入るとしている。この場合IgE産生量は、リボソーム型では水酸化アルミニウム型に比べて約30分の1に低下している。しかしながら、リボソーム組成次第で抗原がリボソームから漏洩する場合があります、漏洩した抗原がIgEと結合してアレルギー症状を引起すという問題点がある。

【0005】またUSP5049390には、アレルゲンをリボソームに結合させた免疫治療剤が記載され、この免疫治療剤によればIgEの産生を抑制してIgGの産生を増加させ得ることが記載されている。しかし上記公報にはIgGおよびIgEの定量的な産生量は記載されておらず、in vitroにおけるIgGおよびIgEの産生が定性的に示されているだけであり、アレルギー治療効果は不十分である。

20 【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、IgEの産生を抑制してIgGの産生を増大させ、アレルギー症状を緩和させることができ、しかも安定性に優れ、凍結乾燥により長期間の安定保存が可能なリボソーム型アレルギー治療薬を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明は次のリボソーム型アレルギー治療薬である。

(1) アミノ基を有するリン脂質を膜構成成分として含有し、粒径が0.1～3 μ mのリボソームの外水相側のみに抗原が固定化されたリボソームからなるアレルギー治療薬であって、内外水相に糖を含むことを特徴とするリボソーム型アレルギー治療薬。

(2) IgE産生増強量に対するIgG産生増強量の比が、抗原単独のIgE産生増強量に対するIgG産生増強量の比と比べて5～100倍であることを特徴とする上記(1)記載のリボソーム型アレルギー治療薬。

(3) 抗原がアレルギーを引起すアレルギー抗原であることを特徴とする上記(1)または(2)記載のリボソーム型アレルギー治療薬。

(4) アレルギー抗原がダニ抗原、ブタクサ抗原、カモガヤ抗原およびスギ花粉抗原からなる群から選ばれるアレルギー抗原であることを特徴とする上記(3)記載のリボソーム型アレルギー治療薬。

50 【0008】本発明で用いることができるアミノ基を有するリン脂質としては、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリンまたはホスファチジルスレオニンなどがあげられ、一種単独で、または二種以上組合せて使用できる。これらのリン脂質は1位、2位の2つの脂肪酸残基は任意に選択することができ、その脂肪酸

残基は天然物由来または合成品由来のいずれのものでもよく、混合脂肪酸、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、重合性脂肪酸などに由来する炭素数4〜30の脂肪酸残基があげられる。

【0009】上記飽和脂肪酸としては炭素数12〜24のものが好ましく、例えばラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸などがあげられる。また上記不飽和脂肪酸としては炭素数14〜22、不飽和結合1〜6のものが好ましく、例えばオレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキドン酸などがあげられる。この

ようなアミノ基を有するリン脂質の中では、天然物由来のものとしては卵黄または大豆由来のリン脂質が好ましい。

【0010】リボソームの膜構成成分（膜形成成分）としては、アミノ基を有するリン脂質の他にもリボソームを形成しうる他の化合物も使用でき、例えば大豆レシチン、卵黄レシチン、ホスファチジルグリセロール、その他のリン脂質類、コレステロール、脂肪酸、脂肪酸塩など、従来からリボソームの膜構成成分として用いられているものが使用できる。

【0011】膜構成成分全体に占めるアミノ基を有するリン脂質の割合は0.01〜100モル%、好ましくは0.1〜30モル%とするのが望ましい。アミノ基を有するリン脂質の割合を多くするほど、リボソームの外水相側に固定化することができる抗原の量を多くすることができる。従って、アミノ基を有するリン脂質の割合を調節することにより、外水相側に固定化する抗原の量を調節することができる。

【0012】リボソームの外水相側のみに固定化する抗原としては、アレルギーの原因となっている抗原が使用できる。具体的には、ハウスダスト；ダニ抗原；ブタクサ抗原、カモガヤ抗原、スギ花粉抗原、ヨモギ、カナムグラ、ヒメガマ等の花粉類；米、小麦粉、ソバ粉等の穀類；牛乳、卵黄、卵白等の食品類；犬毛、猫毛、羽毛等の表皮類；カンジダ、アスペルギルス等の真菌類などのアレルギー抗原があげられる。これらの中ではダニ抗原、ブタクサ抗原、カモガヤ抗原、またはスギ花粉抗原が好ましく使用できる。上記抗原は1種単独で使用することもできるし、2種以上を組合せて使用することもできる。

【0013】抗原を固定化する前のリボソームは、エクソソージョン法、ボルテックスミキサー法、超音波法、界面活性剤除去法、逆相蒸発法、エタノール注入法、プレベシクル法、フレンチプレス法、W/O/Wエマルジョン法、アニーリング法、凍結融解法など、種々の公知の方法により製造することができる。また、これらの製造法を選択することにより、多重層リボソーム、小さな一枚膜リボソーム、大きな一枚膜リボソームなど、種々の大きさや形態を有するリボソームを製造することができる。本発明ではどの形態のリボソームでも使

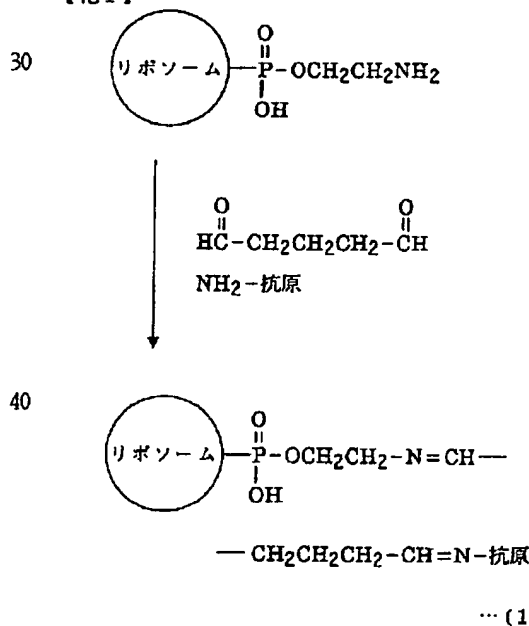
用することができる。上記方法により、リボソームの内水相側（外表面、内側および内表面）にアミノ基が存在するリボソームが得られる。リボソームの粒径は0.1〜3 μ m、好ましくは0.2〜2.5 μ mである。リボソームの粒径が上記上限値を超えると、ゲル化してしまい、本発明の治療薬として使用できない。

【0014】上記のようにして得られたアミノ基が存在するリボソームの外水相側のみに抗原を固定化するには、グルタルアルデヒドを用いてホスファチジルエタノールアミン等のリン脂質のアミノ基と抗原のアミノ基とを直接架橋させる方法、反応活性試薬を用いてホスファチジルエタノールアミン等のリン脂質のアミノ基と抗原のアミノ基とを化学結合させる方法などの公知の方法が採用できる。

【0015】上記反応活性試薬としては、N-ヒドロキシスクシンイミジル 3-(2-ピリジチオ)プロピオネート (N-hydroxysuccinimidyl 3-(2-pyridylthio)propionate)、m-マレイミドベンジール-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester)、ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート) (Dithiobis(succinimidylpropionate))、ビス(スルホスクシンイミジル)スベレート (Bis(sulfosuccinimidyl)suberate)、ジスクシンイミジルスベレート (Disuccinimidyl suberate) などがあげられる。

【0016】グルタルアルデヒドを用いた抗原の固定化反応は次式(1)で示される。

【化1】



【0017】抗原の固定化反応は、水系溶媒、例えば蒸留水；生理的食塩水；リン酸緩衝液、炭酸緩衝液、トリ

溶媒と、エタノール、メタノール、1, 4-ジオキサン等の有機溶媒との混合溶媒中で、pH1~12、好ましくはpH7~10、反応温度0~100℃、好ましくは0~60℃で、反応時間30分間~200時間、好ましくは1時間~24時間の条件で行うことができる。

【0018】このようにして反応させることにより、リボソームの外水相側のアミノ基と抗原のアミノ基等とがグルタルアルデヒドまたは活性試薬の残基を介して共有結合により結合し、リボソームの外水相側のみに抗原が固定化された抗原結合リボソームが得られる。反応終了後は、グリシン等のアミノ基を有する化合物を加えて未反応のグルタルアルデヒドまたは活性試薬を失活させた後、ゲルろ過、透析、限外ろ過、遠心分離などの方法により容易に単離、精製することができる。また凍結乾燥などの方法により乾燥して保存することができ、必要に応じて再生することができる。

【0019】本発明のリボソーム型アレルギー治療薬は、外水相側のみに抗原が固定化され、リボソームの内外水相、すなわち内水相および外水相の水相に糖を含むリボソームからなるアレルギー治療薬である。リボソームの内外水相に含ませる糖としては、例えばグルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトース、イノシトール、リボース、キシロース等の単糖類；サッカロース、ラクトース、セロビオース、トレハロース、マルトース等の二糖類；ラフィノース、メレイトース等の三糖類；シクロデキストリン等のオリゴ糖；デキストリン等の多糖類；キシリトール、ソルビトール、マンニトール、マルチトール等の糖アルコールなどがあげられる。これらの中では単糖類または二糖類が好ましく、中でもグルコースまたはサッカロースが好ましい。

【0020】リボソームの内外水相に含ませる糖の濃度は0.05~0.5M、好ましくは0.15~0.35Mとするのが好ましい。この場合、糖を溶解する溶媒としては、水系溶媒、例えば蒸留水；生理的食塩水；リン酸緩衝液、炭酸緩衝液、トリス緩衝液、酢酸緩衝液等の緩衝液などが使用できる。このような水系溶媒のpHは5~10、好ましくは6~8であるのが望ましい。

【0021】糖をリボソームの水相に含ませる方法は特に限定されず、公知の方法が採用でき、例えばリボソーム調製時に予め糖を溶解させた溶液を用いる方法、あるいはリボソームに抗原を固定化して抗原結合リボソームを調製した後、浸透圧勾配法などを用いて外水相に添加した糖を内水相にも内包させる方法などを採用することができる。これらの中では、リボソーム調製時に予め糖を溶解させた溶液を用いる方法が好ましい。

【0022】本発明のアレルギー治療薬は、リボソームの外水相側のみに抗原が結合しているため、このような治療薬を用いると、アレルギー症状を悪化させるIgEの産生が抑制され、しかもIgGの産生が増強される。このためIgE産生増強率（1次免疫に対する2次免疫

の比）に対するIgG産生増強率（1次免疫に対する2次免疫の比）の比、すなわちIgG産生増強率/IgE産生増強率比が大きく、例えば抗原単独の水溶液を使用した場合と比べて、タイター（titer）比で5~100倍となり、アレルギー患者の減感作療法用のアレルギー治療薬として好適に使用される。また本発明のアレルギー治療薬は特定の粒径を有するリボソームの内外水相に糖が含まれているので、安定性に優れており、凍結乾燥したのち再び水系溶媒でリボソームを再生しても凝集などは生じない。このため凍結乾燥により長期間安定して保存することができる。

【0023】なお上記タイター比の値は、血中IgGおよびIgEを下記ELISA法で測定した場合の産生比である。

ELISA法（IgG抗体検出）：

1）抗原によるプレートのコーティング

抗原を、1mg/mlの濃度で0.05M炭酸緩衝液（pH9.0）に溶解し、96穴のアッセイプレートに50μl/ウェルずつ分注し、室温に1時間放置する。

2）プレートのブロッキング

ウシ血清アルブミン（以下、BSAという）を0.2Mリン酸緩衝液（pH7.2：PBS）に1mg/mlの濃度で溶解し、上記1）のプレートに100μl/ウェルずつ分注し、室温に1時間放置する。

3）血清サンプル（1次抗体）の希釈、添加

1mg/mlの濃度でBSAを含むPBS（以下、PBSAという）中で水酸化アルミニウム-抗原、または本発明のアレルギー治療薬で免疫したマウス血清を10倍希釈から始めて2倍段階で11回希釈を行い、上記2）のプレートに50μl/ウェルずつ分注し、室温に1時間放置する。

4）ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIgG抗体溶液（2次抗体）の添加

上記3）のプレートをPBSにて3回洗った後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIgG抗体のPBSA溶液を50μl/ウェルずつ分注し、室温に1時間放置する。

5）酵素基質溶液の添加

上記4）のプレートをPBSにて3回洗った後、クエン酸緩衝液に溶解したオ-フェニレンジアミンジヒドロクロリド（0.5mg/ml）を100μl/ウェルずつ分注し、室温に15分間放置し、発色させる。発色後、2M硫酸を50μl/ウェルずつ分注して反応を停止する。

6）吸光度計を用いた測定

ELISA用プレートリーダーを用いて490nmの吸光で測定を行い、発色のエンドポイントを求めて、そのポイントでのサンプル血清の平均希釈倍率をもってELISAタイターとする（ELISAタイターをIgGの定量値として用いる。）。

【0024】ELISA法(IgE抗体検出):

1) ラットモノクローナル抗体マウスIgE抗体によるプレートのコーティング

マウスIgE抗体に対するラットのモノクローナル抗体を0.05M炭酸緩衝液(pH9.0)で4μg/mlの濃度に調整したものを96穴のアッセイプレートに100μl/ウェルずつ分注し、37℃で3時間放置する。

2) プレートのブロッッキング

ウシ血清アルブミン(BSA)を0.2Mリン酸緩衝液(pH7.2:PBS)に1mg/mlの濃度で溶解し、上記1)のプレートに100μl/ウェルずつ分注し、室温に1時間放置する。

3) 血清サンプル(1次抗体)の希釈、添加

1mg/mlの濃度でBSAを含むPBS(PBSA)中で、水酸化アルミニウム-抗原または本発明の治療薬で免疫したマウス血清を10倍希釈から始めて2倍段階で11回希釈を行い、上記2)のプレートに50μl/ウェルずつ分注し、室温に1時間放置する。

4) ビオチン化抗原の添加

上記3)のプレートをPBSにて3回洗った後、ビオチン化した抗原溶液のPBSA溶液(1μg/ml)を100μl/ウェルずつ分注し、室温に1時間放置する。

5) ヘルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン溶液の添加

上記4)のプレートをPBSにて3回洗った後、ヘルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン溶液を100μl/ウェルずつ分注し、室温に1時間放置する。

6) 酵素基質溶液の添加

上記5)のプレートをPBSにて3回洗った後、クエン酸緩衝液に溶解したo-フェニレンジアミンジヒドロクロリド(0.5mg/ml)を100μl/ウェルずつ分注し、室温に15分間放置し、発色させる。発色後、2M硫酸を50μl/ウェルずつ分注して反応を停止する。

7) 吸光度計を用いた測定

ELISA用プレートリーダーを用いて490nmの吸光で測定を行い、発色のエンドポイントを求めて、そのポイントでのサンプル血清の平均希釈倍率をもってELISAタイターとする(ELISAタイターをIgEの定量値として用いる。)

【0025】

【発明の効果】本発明のリボソーム型アレルギー治療薬は、リボソームの外水相側のみに抗原が固定化されているので、IgEの産生を抑制してIgGの産生を増大させることができ、このためアレルギー症状を緩和させることができ、特に減感作療法用のアレルギー治療薬として好適に使用できる。また特定の粒径を有し、内外水相に糖を含んでいるので、凍結乾燥によっても安定性が高く、長期安定保存が可能である。

【0026】

【発明の実施の形態】次に本発明の実施例について説明する。

参考例1(リボソームの作製)

ジバシルミトイルホスファチジルコリン0.9175g(1.25mmol)、ジバシルミトイルホスファチジルエタノールアミン0.6490g(0.938mmol)、コレステロール0.8445g(2.19mmol)およびジミリストイルホスファチジルグリセロールNa塩0.4305g(0.625mmol)をナス型フラスコに取り、クロロホルム/メタノール/水(65/25/4、容量比)混合溶剤50mlを入れ、40℃にて溶解した。次にロータリーエバポレーターを使用して減圧下に溶剤を留去し、脂質の薄膜を作った。さらに注射用蒸留水を30ml添加し、攪拌して均一のスラリーを得た。このスラリーを液体窒素にて凍結させ、凍結乾燥機にて24時間乾燥させた。

【0027】次に、別途作製した緩衝液(0.12mM Na₂HPO₄、0.88mM KH₂PO₄、0.25M サッカロース、pH6.5)60mlを上記ナス型フラスコ内に入れ、40℃にて攪拌しながら脂質を水和させ、リボソームを得た。次にエクストルーダーを用いてリボソームの粒径を調整した。まず8μmのポリカーボネートフィルターを通過させ、続いて5μm、3μm、1μm、0.65μm、0.22μmの順にフィルターを通過させた。1μm、0.65μm、0.22μm通過時点のサンプルを採取して実施例の試験に供した。なお、リボソームの粒径を動的分散法粒度分布計(NICOMPモデル370HPL、パシフィックサイエンティフィック社製、商標)で測定したところ、平均粒径は1μm、0.65μm、0.22μm通過のサンプルでそれぞれ1.428μm、0.664μm、0.167μmであった。

【0028】実施例1

ダニ抗原を使用して抗体産生試験を次のようにして行った。

①水酸化アルミニウム-ダニ抗原ワクチンの調製

水酸化アルミニウム15mg/ml in PBS [Al(OH)₃の沈殿をホモジナイザーにかけ、エマルジョンとしたもの]に、ダニ抗原を最終濃度10μg/mlとなるように混合し、水酸化アルミニウム混合ワクチンを調製した。このワクチンをマウス当り200μl腹腔注射して免疫した。

【0029】②ダニ抗原結合リボソームの調製

参考例1のリボソームで1μm、0.65μm、0.22μm通過品のそれぞれ2mlを試験管に採取し、0.5mlのダニ抗原溶液(10mg/ml)を加えた。次に、2.4%のグルタルアルデヒド溶液0.5mlを滴下した後、37℃の温浴上で1時間緩やかに混合し、リボソームの外水相側にダニ抗原を固定化した。次に2

Mのグリシン-NaOH緩衝液(pH7.2)0.5mlを加え、溶液を4℃で一晩放置し、未反応のグルタルアルデヒドを失活させた。さらにSephacrose CL-4B(Pharmacia Biotech社製、商標)を充填したカラムにこの溶液を通し、外水相側にグルタルアルデヒドを介してダニ抗原が結合したリボソームを分画し、抗原結合リボソームを得た。

【0030】③抗体産生試験

前記①で調製したワクチンを投与したマウスを3つの群に分割し、4週間後にそのままの群(コントロール群)、2次免疫群としてダニ抗原溶液100μgを腹腔内に注射した群(ダニ抗原単独投与群)、または前記②で調製したダニ抗原結合リボソームをリボソームの脂質量として0.5~2.0mgの範囲で1匹当たり200*

IgG増強率=2次免疫後のIgG値/コントロールのIgG値…(1)

IgE増強率=2次免疫後のIgE値/コントロールのIgE値…(2)

【0033】④IgG抗体検出

ELISA法によりIgG抗体検出を次のようにして行った。

1) 抗原によるプレートのコーティング

ダニ抗原を、10μg/mlの濃度で0.05M炭酸緩衝液(pH9.0)に溶解し、96穴のアッセイプレートで50μl/ウェルずつ分注し、室温に1時間放置した。

2) プレートのブロッキング

ウシ血清アルブミン(BSA)を0.2Mリン酸緩衝液(pH7.2:PBS)に1mg/mlの濃度で溶解し、上記1)のプレートに100μl/ウェルずつ分注し、室温に1時間放置した。

3) 血清サンプル(1次抗体)の希釈、添加

1mg/ml濃度でBSAを含むPBS(PBSA)中で、コントロール群のマウス血清、ダニ抗原液で増強させたマウス血清、あるいは抗原結合リボソームにて増強させたマウス血清をそれぞれ10倍から始めて2倍段階で11回希釈を行い、上記2)のプレートに50μl/ウェルずつ分注し、室温に1時間放置した。

4) ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIgG抗体溶液(2次抗体)の添加

上記3)のプレートをPBSにて3回洗った後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIgG抗体のPBSA溶液を50μl/ウェルずつ分注し、室温に1時間放置した。

5) 酵素基質溶液の添加

上記4)のプレートをPBSにて3回洗った後、クエン酸緩衝液に溶解したo-フェニレンジアミンジヒドロクロリド(0.5mg/ml)を100μl/ウェルずつ分注し、室温に15分間放置し、発色させた。発色後、2M硫酸を50μl/ウェルずつ分注して反応を停止した。

6) 吸光度計を用いた測定

*μl腹腔内に注射した群(ダニ抗原結合リボソーム型アレルギー治療薬投与群、以下リボソーム剤投与群と略記する場合がある)とした。

【0031】その後、マウス血清中の抗原特異的IgG抗体およびIgE抗体をELISA法により後述のようにして定量した。そしてコントロール群のIgGおよびIgE値に対して、2次免疫群で変化したIgGおよびIgE値を増強率として下記数式(1)または(2)から算出した。また減感作の指標となるIgE増強率に対するIgG増強率の比を計算し、全ての値と共に表1に示す。

【0032】

【数1】

※ELISA用プレートリーダーを用いて490nmの吸光で測定を行い、発色のエンドポイントを求めて、そのポイントでのサンプル血清の希釈倍率をもってELISAタイターとする(ELISAタイターをIgGの定量値として用いた。)

【0034】⑤IgE抗体検出

ELISA法によりIgE抗体検出を次のようにして行った。

1) ラットモノクローナル抗体マウスIgE抗体によるプレートのコーティング

マウスIgE抗体に対するモノクローナル抗体を0.05M炭酸緩衝液(pH9.0)で4μg/mlの濃度に調整したものを96穴のアッセイプレートに100μl/ウェルずつ分注し、37℃に3時間放置した。

2) プレートのブロッキング

ウシ血清アルブミン(BSA)を0.2Mリン酸緩衝液(pH7.2:PBS)に1mg/mlの濃度で溶解し、上記1)のプレートに100μl/ウェルずつ分注し、室温に1時間放置した。

3) 血清サンプル(1次抗体)の希釈、添加

1mg/ml濃度でBSAを含むPBS(PBSA)中で、コントロール群のマウス血清、ダニ抗原液で増強させたマウス血清を10倍希釈から始めて2倍段階で11回希釈を行い、上記2)のプレートに50μl/ウェルずつ分注し、室温に1時間放置した。

4) ビオチン化抗原の添加

上記3)のプレートをPBSにて3回洗った後、ビオチン化した抗原溶液のPBSA溶液(1μg/ml)を100μl/ウェルずつ分注し、室温に1時間放置した。

5) ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン溶液の添加

上記4)のプレートをPBSにて3回洗った後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン溶液を100μl/ウェルずつ分注し、室温に1時間放置した。

11

6) 酵素基質溶液の添加

上記5)のプレートをPBSにて3回洗った後、クエン酸緩衝液に溶解した α -フェニレンジアミンジヒドロクロリド(0.5mg/ml)を100 μ l/ウェルずつ分注し、室温に15分間放置し、発色させた。発色後、2M硫酸を50 μ l/ウェルずつ分注して反応を停止した。

7) 吸光度計を用いた測定

*

表1

ダニ抗原結合リボソームによる2次免疫後の経時的抗体産生量比

	免疫後経過 * 1				増強率 の比 * 2	C/B * 3
	1 次免疫 4 週後		2 次免疫 1 週後			
	I g G	I g E	I g G	I g E		
A : コントロ ール群	2, 560	180	2, 560	180	1	—
B : ダニ抗原 単独投与群	2, 560	180	5, 200	1, 440	0. 25	1
C : 実施例 1 * 4	2, 560	180	20, 480	180	8	32

【0036】表1の注

*1 単位: IgG; ELISA-titer
IgE; ELISA-titer

*2 増強率の比: IgG増強率/IgE増強率

*3 C/B: リボソーム剤投与群(C欄)のIgG増強率/IgE増強率の値をダニ抗原単独投与群(B欄)のIgG増強率/IgE増強率の値で除した値。

*4 ダニ抗原結合リボソーム型アレルギー治療薬投与群

【0037】実施例2

実施例1において、ダニ抗原の代わりにスギ花粉抗原を用いて、調製方法および試験方法を下記のように変更した以外は、実施例1と同様にして行った。結果を表2に示す。

【0038】①水酸化アルミニウムスギ花粉ワクチンの調製

ダニ抗原の代わりにスギ花粉抗原(SBP)を用いた以外は実施例1と同様にして調製した。

②スギ花粉抗原結合リボソームの調製

抗原溶液の濃度を10mg/mlから2.9mg/mlに変更した以外は実施例1と同様にして調製した。

【0039】③抗体産生試験

前記①で調製したワクチンを投与したマウスを3つの群※

12

*ELISA用プレートリーダーを用いて490nmの吸光で測定を行い、発色のエンドポイントを求めて、そのポイントでのサンプル血清の平均希釈倍率をもってELISAタイターとした(ELISAタイターをIgEの定量値として用いた。)

【0035】

【表1】

※に分割し、4週間後にそのままの群(コントロール

群)、2次免疫群としてスギ花粉抗原溶液100 μ gを腹腔内に注射した群(スギ花粉抗原単独投与群)、または前記②で調製したスギ花粉抗原結合リボソームをリボソームの脂質量として0.5~2.0mgの範囲で1匹当たり200 μ l腹腔内に注射した群(スギ花粉抗原結合リボソーム型アレルギー治療薬投与群、以下リボソーム剤投与群と略記する場合がある)とした。その後、マウス血清中の抗原特異的IgG抗体およびIgE抗体をELISA法により定量した。そしてコントロール群のIgGおよびIgE値に対して、2次免疫群で変化したIgGおよびIgE値を増強率として前記数式(1)または(2)から算出した。

40 【0040】④IgG抗体検出

1)の抗原によるプレートのコーティングの操作において使用した抗原の濃度を10 μ g/mlから5 μ g/mlに変更した以外は実施例1と同様にして行った。

⑤IgE抗体検出

実施例1と同様にして行った。

【0041】

【表2】

表2

スギ花粉抗原結合リボソームによる2次免疫後の経時的抗体産生量比

	免疫後経過 * 1				増強率 の比 * 2	C/B * 3
	1 次免疫 4 週後		2 次免疫 1 週後			
	I g G	I g E	I g G	I g E		
A : コントロー ル群	120	90	120	90	1	—
B : スギ花粉抗 原単独投与群	120	90	144	250	0.4	1
C : 実施例 2 * 4	120	90	250	90	2.1	5.3

【0042】表2の注

*1 単位: IgG; ELISA-titer
IgE; ELISA-titer

*2 増強率の比: IgG増強率/IgE増強率

*3 C/B: リボソーム剤投与群(C欄)のIgG増強率/IgE増強率の値をスギ花粉抗原単独投与群(B欄)のIgG増強率/IgE増強率の値で除した値。

*4 スギ花粉抗原結合リボソーム型アレルギー治療薬投与群

【0043】比較例1

比較のためにリボソームにダニ抗原を内包させた混合の抗体産生試験の例を示す。ジバルミトイルホスファチジルコリン0.3211g(0.437mmol)、コレステロール0.1689g(0.438mmol)およびジミリストイルホスファチジルグリセロールNa塩0.0861g(0.125mmol)をナス型フラスコに取り、クロロホルム/メタノール(2/1、容量比)混合溶剤30mlを入れて40℃にて溶解した。次にロータリーエバポレーターを使用して減圧下に溶剤を留去させ、脂質の薄膜を作った。さらに注射用蒸留水を30ml添加し、攪拌して均一のスラリーを得た。この*

* スラリーを液体窒素にて凍結させ、凍結乾燥機にて24時間乾燥させ粉末を得た。

【0044】この粉末0.1440gを丸底フラスコに取り、ダニ抗原の水溶液(12.5mg/ml)5mlを入れ、40℃にて攪拌しながら脂質を水和させた。次にエクストルーダーを用いてリボソームの粒径を調整した。まず5μmのポリカーボネートフィルターを通過させ、3μm、1μmの順に通過させた。1μm通過のサンプルをSephacrose CL-4B(Pharmacia Biotech社製、商標)を充填したカラムに通し、ダニ抗原内包リボソームを分割採取した。なお、1μm通過のサンプルについてリボソームの粒径を参考例1と同様にして測定したところ、平均粒径は1.382μmであった。

【0045】実施例1において、ダニ抗原結合リボソーム型アレルギー治療薬の代わりに上記ダニ抗原内包リボソームを用いて、実施例1と同様にして抗体産生試験を行った。結果を表3に示す。

【0046】

【表3】

15
表3

16

ダニ抗原内包リボソームによる2次免疫後の経時的抗体産生量比

	免疫後経過 * 1				増強率 の比 * 2	C/B * 3
	1次免疫4週後		2次免疫1週後			
	I g G	I g E	I g G	I g E		
A : コントロ ール群	2, 560	180	2, 560	180	1	—
B : ダニ抗原 単独投与群	2, 560	180	5, 200	1, 440	0. 25	1
C : 比較例 1 * 4	2, 560	180	20, 480	1, 280	1. 1	4. 4

【0047】表3の注

* 1~* 3 表1参照

* 4 ダニ抗原内包リボソーム投与群

【0048】表1~表3の結果から、リボソームに抗原を内包させるとIgEの産生を促進させることになり、IgE値を上昇させない実施例1、2との違いが明白であることが分かる。

【0049】比較例2

比較のために、糖を含有しないリボソームの保存安定性試験の例を示す。

①リボソームの作製

ジバールミトイルホスファチジルコリン0.9175g (1.25mmol)、ジバールミトイルホスファチジルエタノールアミン0.6490g (0.938mmol)、コレステロール0.8445g (2.19mmol) およびジミリストイルホスファチジルグリセロールNa塩0.4305g (0.625mmol) をナス型フラスコに取り、クロロホルム/メタノール/水(65/25/4、容量比)混合溶剤50mlを入れて40℃にて溶解した。次にリン酸緩衝液(pH: 7.2) 10mlを加え、ロータリーエバポレーターを使用して減圧下に溶剤を留去させ、ゲルを作製した。ボルテックスミキサーにて1分間振とうさせた後リン酸緩衝液50mlをフラスコ内に入れ、40℃にて10分間攪拌した。次にエクストルーダーを用いてリボソームの粒径を調整した。まず8μmのポリカーボネートフィルターを通過させ、続いて5μm、3μm、1μmの順に通過させた。

【0050】②抗原結合リボソームの調製

上記①のリボソームで8μm、5μm、3μm通過品のそれぞれ2mlを試験管に採取し、0.5mlのダニ抗原溶液(12mg/ml)を入れた。次に、2.4%の*

* グルタルアルデヒド溶液0.5mlを滴下した後、37℃の温浴上で1時間緩やかに混合した。その結果それぞれのリボソームは凝集した。糖を含有させた場合には一部のリボソームのみが凝集したが、糖無添加では8μmから3μmまでのリボソームで全て凝集した。

【0051】次にサイズの小さな1μm通過品を使用してダニ抗原結合リボソームを作製した。すなわち、前記①のリボソームで1μm通過品2mlを試験管に採取し、0.5mlのダニ抗原溶液(12mg/ml)を入れた。次に2.4%のグルタルアルデヒド溶液0.5mlを滴下した後、37℃の温浴上で1時間緩やかに混合した。この場合もリボソームの凝集がやや見られたがそのまま次の反応に移行した。すなわち、2Mのグリシン-NaOH緩衝液(pH7.2)を0.5mlを加えて溶液を4℃で一晩放置し、未反応のグルタルアルデヒドを失活させた。さらにSephacryl CL-4B(Pharmacia Biotech社製、商標)を充填したカラムにこの溶液を通し、外水相側リボソーム表面にグルタルアルデヒドを介してダニ抗原が結合したリボソームを分画し、抗原結合リボソームを得た。

【0052】③保存安定性試験

上記②で作製した抗原結合リボソーム(リン酸緩衝液使用品)および実施例1で作製した抗原結合リボソーム(糖含有液使用品)をそれぞれ5ml採取し、液体窒素で凍結した後6時間凍結乾燥させた。次に注射用蒸留水をそれぞれ5ml添加してリボソーム形状を観察した。復水後に凝集の生じなかった実施例1のものについては、実施例1と同様にして粒径を測定した。結果を表4に示す。

【0053】

【表4】

17
表4

18

		復水後のリボソームの形状	復水後のリボソームの平均粒径
実施例1 糖含有液使用品	0.22 μ m通過品	◎	0.190 μ m
	0.65 μ m通過品	◎	0.692 μ m
	1.0 μ m通過品	◎	1.492 μ m
比較例2 リン酸緩衝液使用品	1.0 μ m通過品	×	—

評価基準 ◎：リボソームの凝集なし

×：リボソームかなり凝集あり

【0054】表4の結果から分かるように、糖を使用しない比較例2のリボソームは凝集し易く、作製に困難が生じた。さらに凍結乾燥処理を経てタンパク質の相互作用によるリボソームの凝集が生じることが分かる。これに対して実施例1のリボソームでは、糖を添加することにより作製時の凝集も防止（3 μ m以下）することができ、また内外水相に糖を含むリボソームは凍結乾燥処理しても凝集が生じず、安定性に優れていることが分かる。

【0055】比較例3

比較のために、内外相の双方に抗原が固定化され、糖を含有しないリボソームの保存安定性試験の例を示す。

①抗原結合リン脂質の作製

ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン0.0649g（0.0938mmol）をナス型フラスコに入れ、クロロホルム/メタノール/水（65/25/4、容量比）混合溶剤20mlを入れて40℃にて溶解させた。次にロータリーエバポレーターを使用して減圧下に溶剤を留去し、脂質の薄膜を作製した。さらに1.5mlのダニ抗原溶液（12mg/ml）を入れ、次に2.4%のグルタルアルデヒド溶液1.5mlを滴下した後、37℃の温浴中で1時間緩やかに混合した。その後2Mのグリシン-NaOH緩衝液（pH7.2）を1.5ml加えて溶液を4℃にて一晩放置し、未反応のグルタルアルデヒドを失活させた。さらにSephacrose CL-4B（Pharmacia Biotech社製、商標）を充填させたカラムにこの液を通し、グルタルアルデヒドを介してダニ

*ニ抗原が結合したフラクションを分画した。

【0056】②内外相にダニ抗原が結合したリボソームの作製

ジパルミトイルホスファチジルコリン0.09175g（0.125mmol）、コレステロール0.08445g（0.219mmol）およびジミリスチルホスファチジルグリセロールNaOH塩0.04305g（0.0625mmol）をナス型フラスコに採り、クロロホルム/メタノール/水（65/25/4、容量比）混合溶剤20mlを入れて40℃にて溶解させた。次にロータリーエバポレーターを使用して減圧下に溶剤を留去し、脂質の薄膜を作製した。さらに上記①で作製したグルタルアルデヒドを介したダニ抗原結合リン脂質溶液を添加した。ボルテックスミキサーにて攪拌（30秒間）した後、エクストルーダーを用いてリボソームの粒径を調整した。まず5 μ mのポリカーボネートフィルターを通過させ、3 μ m、1 μ m、0.65 μ mの順に通過させた。これらのリボソームの粒径を参考例1と同様にして測定した。結果を表5に示す。

【0057】③保存安定性試験

上記②で得られた内外相にダニ抗原が結合し、糖を含まないリボソームを、それぞれの粒径で約2ml採り、液体窒素で凍結した後6時間乾燥させた。次に注射用蒸留水をそれぞれ2ml添加してリボソーム形状を観察した。結果を表5に示す。

【0058】

【表5】

表5

	復水前のリボソームの 平均粒径	復水後のリボソームの 形状
3 μm 通過品	測定不能	×
1 μm 通過品	1.424 μm	×
0.65 μm 通過品	0.684 μm	×

評価基準 ◎：リボソームの凝集なし

×：リボソームかなり凝集あり

【0059】表5の結果から、糖を含有しない場合は抗 * ソームの安定性は損なわれることがわかる。
原が内外相に結合していても、凍結乾燥保存によりリボ*

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

A61K 39/36
47/24

識別記号

片内整理番号

F I

A61K 39/36
47/24

技術表示箇所

D